

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特許公報 (B2)

(11) 特許出願公告番号

特公平7-46988

(24) (44) 公告日 平成7年(1995)5月24日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup> C 12 N 5/06 C 12 M 3/00	識別記号 A	序内整理番号 8412-4B	F I C 12 N 5/00	技術表示箇所 E
---	-----------	-------------------	--------------------	-------------

発明の数2(全7頁)

(21) 出願番号	特願昭61-57655
(22) 出願日	昭和61年(1986)3月14日
(65) 公開番号	特開昭62-215386
(43) 公開日	昭和62年(1987)9月22日
特許法第30条第1項適用申請有り 理研シンポジウム講演要旨集「分離型反応器」(昭和61年1月31日)理化学研究所発行第18~22ページに発表	

(71) 出願人	99999999 日東電工株式会社 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号
(72) 発明者	船津 和守 福岡県春日市一の谷6-45
(72) 発明者	朽山 正吉 福岡県福岡市城南区長尾4-10-23
(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
審査官	植野 浩志
(56) 参考文献	特開 昭59-154984 (JP, A) 特開 昭61-25476 (JP, A) 特開 昭62-122586 (JP, A)

(54) 【発明の名称】付着性動物細胞の培養法および培養装置

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】平均細孔径が100μm～1mmである、多孔性ポリウレタン発泡体に培地液を含浸し、もしくは該多孔性ポリウレタン発泡体を培地液に浸漬し、該多孔性ポリウレタン発泡体に付着性動物細胞を付着させて該付着性動物細胞を培養することを包含する付着性動物細胞の培養法。

【請求項2】前記ポリウレタンの分子内にペプタイドマトリックスが形成された特許請求の範囲第1項に記載の培養法。

【請求項3】前記ペプタイドマトリックスを形成するペプタイドがコラーゲン、アルブミンもしくはゼラチンである特許請求の範囲第2項に記載の培養法。

【請求項4】前記ポリウレタン発泡体の発泡倍率が10～20倍である特許請求の範囲第1項または第2項に記載の

2

培養法。

【請求項5】前記付着性動物細胞が、アフリカミドリザル腎細胞(Vero細胞)、正常コウモリ肺細胞(Tb1Lu)、上皮細胞(940c3)、マウス線維芽細胞(3T3)、ヒト横紋筋サルコーマ細胞(RD)、ヒト横紋筋サルコーマ細胞(A204)、初代ヒナ胚線維芽細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、乳児ハムスター腎細胞(BHK)、初代胎児類細胞、ヒト2倍体細胞(WI-38.MRC-5)、サル腎細胞(Vero, LLC-MK2,CV-1)、初代サル腎細胞、ヒト胚肺細胞(MRC-5)、ウサギ腎細胞(RK-13)、ブタ腎細胞(IBR-52)、イヌ腎細胞、ネコ肺線維芽様細胞または魚細胞である特許請求の範囲第1項に記載の培養法。

【請求項6】静置培養法、充填層培養法、連続培養法もしくは攪拌培養法である特許請求の範囲第1項に記載の

**培養法。**

【請求項7】平均細孔径が $100\mu\text{m} \sim 1\text{mm}$ である多孔性ポリウレタン発泡体に付着して生育する付着性動物細胞を該多孔性ポリウレタン発泡体と共に多孔板上に収容する培養槽と、該培養槽に培地液循環路を介して連結された隔壁塔と、該隔壁塔に培地液供給路を介して連結された培地液供給槽および気体供給路を介して連結された気体供給手段と、を有し、

該隔壁塔にて該培地液と該気体とを接触させ、気体の供給された培地液を該培地液循環路を介して培養槽に供給する付着性動物細胞の培養装置。

【請求項8】前記ポリウレタンの分子内にペブタイドマトリックスが形成された特許請求の範囲第7項に記載の培養装置。

【請求項9】前記ペブタイドマトリックスを形成するペブタイドがコラーゲン、アルブミンもしくはゼラチンである特許請求の範囲第8項に記載の培養装置。

【請求項10】前記ポリウレタン発泡体の発泡倍率が10~20倍である特許請求の範囲第7項または第8項に記載の培養装置。

【請求項11】前記付着性動物細胞が、アフリカミドリザル腎細胞（Vero細胞）、正常コウモリ肺細胞（Tb1Lu）、上皮細胞（940c3）、マウス線維芽細胞（3T3）、ヒト横紋筋サルコーマ細胞（RD）、ヒト横紋筋サルコーマ細胞（A204）、初代ヒナ胚線維芽細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、乳児ハムスター腎細胞（BHK）、初代胎児頚細胞、ヒト2倍体細胞（w1-38.MRC-5）、サル腎細胞（Vero,LLC-MK2,CV-1）、初代サル腎細胞、ヒト胚肺細胞（MRC-5）、ウサギ腎細胞（RK-13）、ブタ腎細胞（IBR-52）、イヌ腎細胞、ネコ肺線維芽様細胞または魚細胞である特許請求の範囲第8項に記載の培養装置。

【請求項12】前記培養槽が培養液中の生理活性物質を回収する手段を有する特許請求の範囲第7項に記載の培養装置。

【請求項13】前記生理活性物質回収手段が限外濾過膜である特許請求の範囲第12項に記載の培養装置。

【請求項14】前記生理活性物質回収手段が前記培養槽に設けられたバルブ付培養液排出口である特許請求の範囲第7項に記載の培養装置。

【請求項15】前記培養槽に培養液攪拌手段を設けた特許請求の範囲第7項に記載の培養装置。

【請求項16】前記隔壁塔の培地液流入口が該隔壁塔の壁面に沿って液留部を有する特許請求の範囲第7項に記載の培養装置。

【請求項17】前記液留部に液流を層流にする層流創製手段を有する特許請求の範囲第16項に記載の培養装置。

【請求項18】前記層流創製手段がビーズ状物である特許請求の範囲第17項に記載の培養装置。

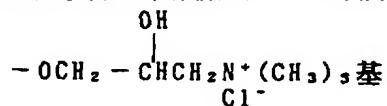
**【発明の詳細な説明】****（産業上の利用分野）**

本発明は付着性動物細胞を多孔性物質を被付着物体として培養する付着性動物細胞の高密度培養法およびその培養装置に関する。

**（従来の技術）**

動物細胞は、培養形態から2つの細胞群に大別される。そのひとつは血液系の細胞に代表される浮遊性の細胞であり、他は、線維芽細胞や上皮性細胞のように細胞が付着する面を必要とする付着性細胞である。浮遊性細胞は培地中に懸濁した状態で増殖するため、微生物の培養に準じた方法で容易に増殖が可能である。他方、付着性細胞は、増殖の足場となる付着面（被付着物体）が必要であるため、大量かつ高密度の培養が困難である。

近年、付着性動物細胞を比較的大量かつ高密度に培養する方法として、マイクロキャリアー培養法、ホロファイバーパー培養法、セラミック多孔質管培養法、マイクロカプセル培養法などが提案されている。なかでも、マイクロキャリアー培養法は、複雑な装置を必要とせず、操作が比較的簡単であるため好適に利用される。マイクロキャリアー培養法は、被付着物体として直径が $100\sim 300\mu\text{m}$ 程度の高分子微粒子（マイクロキャリアー）を用いる方法である。マイクロキャリアーの素材としては、ポリアクリルアミド、デキストラン、ゼラチン、ポリスチレンなどがある。例えば、架橋デキストラン表面に



を導入して表面荷電型としたマイクロキャリアー（サイトデックス2（Cytodex2）：ファルマシア社製）が好適に用いられる。マイクロキャリアー培養法における培養密度は、例えば上記サイトデックス2を培養液 $1\text{ml}$ あたり $3\text{mg}$ の割合で用いてVero細胞（後述）の培養を行った場合、約 $2.0 \times 10^6 \sim 4.0 \times 10^6$ 個/ $\text{ml}$ （マイクロキャリアー固形分）であることが報告されている〔マイクロキャリアー セル カルチャー プリンシブルズ アンド メソッズ、ファルマシア ファイン ケミカルズ（Microcarrier cell culture principles & methods, Pharmacia Fine Chemicals.）〕。しかし、このマイクロキャリアー培養法では、いまだ十分に高密度かつ大量培養が達成されえない。

動物細胞中に含有される微量の生理活性物質を得るなどの目的で、付着性動物細胞の高密度かつ大量培養が可能な方法の開発が望まれている。

**（発明が解決しようとする問題点）**

本発明の目的は、付着性動物細胞を高密度かつ大量に培養する方法を提供することにある。本発明の他の目的は、上記方法に使用される培養装置を提供することにある。

50 （問題点を解決するための手段および作用）

本発明の付着性動物細胞培養法は、多孔性物質に培地液を含浸し、もしくは多孔性物質を培地液に浸漬し、該多孔性物質に付着性動物細胞を付着させて該付着性動物細胞を培養することを包含し、そのことにより上記目的が達成される。

本発明の付着性動物細胞培養装置は、多孔性物質に付着して生育する付着性動物細胞を該多孔性物質と共に多孔板上に収容する培養槽と、該培養槽に培地液循環路を介して連結された漏壁塔と、該漏壁塔に培地液供給路を介して連結された培地液供給槽および気体供給路を介して連結された気体供給手段と、有し、該漏壁塔にて該培地液と該気体とを接触させ、気体の供給された培地液を該培地液循環路を介して培養槽に供給し、そのことにより上記目的が達成される。

本発明に用いられる多孔性物質は、培養を目的とする動物細胞により代謝を受けない物質で吸水能力があればよい。例えば、合成樹脂発泡体や海綿などの天然産生物が利用されうる。合成樹脂発泡体としては、例えば、ポリビニアルコールやポリウレタンなどの発泡体が用いられる。特に、ポリオキシエチレン構造を有するポリウレタンの発泡体は優れた親水性と水保持力とを有するため好適に利用される。

このようなポリウレタンはポリオキシエチレン構造を有するポリオールとポリイソシアネートとを反応させて得られる。ポリオキシエチレン構造を有するポリオールとしては、例えば、ポリエチレングリコール；ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとの混合物；酸化エチレンと酸化プロピレンとの共重合体であるポリエチレングリコール-ポリプロピレングリコールなどが挙げられる。塩基性ポリオールも使用可能である。ここでいう塩基性ポリオールとは、エチレンジアミン、ジエチレントリアミン、メチルアミン、ブチルアミン、ビペラジン、エタノールアミン、プロパンノールアミン、N-メチルジエタノールアミンなどのアミン類に酸化エチレンをポリオキシエチレン状に付加させて得られる。上記ポリオキシエチレン構造を有するポリオールとしては、分子量約400～1000のポリエチレングリコールが好適に用いられる。ポリプロピレン成分がポリエチレングリコールに添加されるときには、その含量が約65重量部を下まわることが好ましい。過剰であると得られる発泡体の親水性が低下する。

上記ポリイソシアネートとしては、例えば、芳香族系、脂肪族系、ポリエーテル系など種々のポリイソシアネートが用いられる。例えば、トリレンジイソシアネート、ジフェニルメタンジイソシアネート、ジフェニルジイソシアネート、ナフタレンジイソシアネート、キシレンジイソシアネート、ブタンジイソシアネート、トリフェニルメタン-4・4'・4"-トリイソシアネートなどが挙げられる。

ポリオキシエチレン構造をもたないポリオールを単独

で、あるいは上記ポリオキシエチレン構造を有するポリオールと混合して用いられうる。このようなポリオールとしては、例えば、グリセリン、トリメチロールエタン、トリメチロールプロパン、1・2・6-ヘキサントリオール、ベンタエリスリトール、ソルビトール、サッカロース、 $\alpha$ -メチルグルコシドが挙げられる。ポリオールとして、セルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロースなどの天然高分子やその誘導体も利用されうる。

10 ポリオールとポリイソシアネートとの反応時に、反応系にコラーゲン、アルブミン、ゼラチンなどのペプタイドを共存させると、分子内にペプタイドマトリックスが形成されたポリウレタンが得られる。分子内にペプタイドマトリックスが形成されたポリウレタンの発泡体を多孔性物質として用いると多孔性物質の含水率が高くなり、多孔性物質と培地液とのぬれが良好になる。その結果、付着性動物細胞と多孔性物質との親和性が高くなり、該細胞の増殖がより速やかになる。

発泡体としては、半連続発泡体、連続発泡体のいずれもが利用されうる。酸素を含む培地液が接触しやすいほどよいため連続発泡体を用いることが好ましい。

多孔性物質の平均細孔径は10μm～5mm、好ましくは100μm～1mmである。細孔径が小さすぎると細胞が多孔性物質内部で増殖しにくくなり、大きすぎると多孔性物質の内部表面積が小さくなる。このような多孔性物質の見かけの比重は0.02～0.1であり、発泡体であれば、その発泡倍率は約10～50倍である。

本発明の培養法で培養し得る細胞は、付着性の動物細胞であればよく、好ましくは、動物の線維芽細胞、リンパ細胞、あるいは上皮細胞である。更に好ましくは、アフリカミドリザル腎細胞（Vero細胞）、正常コウモリ肺細胞（Tb1Lu）、上皮細胞（940c3）、マウス線維芽細胞（3T3）、ヒト横紋筋サルコーマ細胞（RD）、ヒト横紋筋サルコーマ細胞（A204）、初代ヒナ胚線維芽細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、乳児ハムスター腎細胞（BHK）、初代胎児類細胞、ヒト2倍体細胞（w1-38.MRC-5）、サル腎細胞（Vero,LLC-MK2,CV-1）、初代サル腎細胞、ヒト胚肺細胞（MRC-5）、ウサギ腎細胞（RK-13）、ブタ腎細胞（IBR-52）、イヌ腎細胞、ネコ肺線維芽細胞または魚細胞であるが、これらに限定されるものではない。

本発明の多孔性物質を用いた付着性動物細胞の培養法には静置培養法および充填層培養法が含まれる。

本発明の培養法を実施するためには、多孔性物質に付着して生育する付着性動物細胞を該多孔性物質と共に多孔板上に収容する培養槽と、該培養槽に培地液循環路を介して連結された培地液に気体を供給する漏壁塔とを備えた装置が用いられる。漏壁塔には培地液供給槽が連結されている。

50 静置培養を行うには、培養槽の多孔板上に、例えば10mm

以下、好ましくは1～3mmの細片とした多孔性物質を載置し、培地液を供給してこれを多孔性物質に含浸させたのち、培地液もしくは多孔性物質に所望の動物性細胞を接種（播種）する。培地液の量としては、多孔性物質が吸収しうる培地液の量以上であればよく、特に制限はない。静置培養であるので培地液の循環は行われないが1～3日に1度の培地交換を行うことが好ましい。そして、細胞の生育に必要な温度および雰囲気下で培養を行うと、該動物性細胞は多孔性物質表面を足場として速やかに増殖する。多孔性物質に対する培地液量が多い程、動物性細胞の増殖速度が大きく、多孔性物質中での動物性細胞の生育鈍化密度が高い。例えば、ポリウレタン発泡体（PUF）を用いて後述のVero細胞を培養する（PUF23mg、培地2ml）と、 $7.5 \times 10^6$  個/cm<sup>3</sup>（培地液中PUF）という高い飽和密度が得られる。

充填層培養法を実施するには、多孔性物質を培養槽の多孔板上に多層に積層充填しそこに漏壁塔からの気体含有培地液を生育温度下にて供給し、所望の動物性細胞を接種する。そして、漏壁塔からの気体含有培地を培地液循環路を介して連続的に供給する。このような充填槽培養法によれば、充分な酸素等の必要な気体の供給された培地液が動物細胞に供給されるため、高密度培養が達成される。例えば、PUF5.8gを用いてCO<sub>2</sub>を含有する空気を培地中に充分供給しながらVero細胞の培養を行うと、対数増殖期の細胞数倍加時間は71時間であり、24日目には75倍に増殖し、 $1.7 \times 10^7$  個/cm<sup>3</sup>という高密度培養が達成される。

上記装置を用い、培地液を連続して供給すると共に、得られる生理活性物質等の培養生成物を連続的に系外へ取り出すことにより、連続培養法が達成されうる。培養生成物の取り出し手段としては、例えば、培養槽にバルブ付培地液排出口が設けられる。低分子物質を選択的に取り出す限外濾過膜等を用いることも可能である。

付着性動物細胞が多孔性物質表面から剥離しない程度の緩速攪拌を行えば、攪拌培養が達成されうる。この場合には細胞と酸素を多量に含む培地液との接触度合が上がるため、該細胞の生育速度が速くなると共に、培養生成物が培地液中に効果的に拡散するため生成物の収率が向上する。攪拌手段は培養槽内に適宜設けられている。

#### （実施例）

本発明を実施するための予備的な実験例を以下に示す。ここで使用した細胞はVero細胞（その由来、特徴を下に示す）である。

Vero細胞：アフリカミドリザルの腎由來の付着性細胞。形態は線維芽様。樹立細胞系であり、無限増殖する。球形の細胞は直径約13.5μm。ウイルスSV40などの生産に用いられる。ベトリディッシュ底面を付着面として培養すると約18時間で倍加する。

#### 実験例1

DME合成培地（日本製薬社製）にNaHCO<sub>3</sub>、HEPES、ベニシリ

ンGおよびストレプトマイシンを添加し、最終濃度をNaHCO<sub>3</sub> 12.5mM、HEPES5mM、ベニシリング $10^3$  U/lおよびストレプトマイシン0.1g/lに調整したのち、これにさらに牛胎児血清（FBS）を添加して培地液とした。

分子内にペプタイドマトリックスの形成されたPUF（発泡倍率25倍）をミキサーにかけ、3mm以下の細片に粉碎した。不純物を除き、蒸留水で水洗後オートクレーブにて滅菌を行なった。これを上記培地液に侵漬し、PUF表面に血清中の付着糖蛋白質を充分に吸着させた。このPUFと上記培地とをクリーンベンチ内でベトリディッシュに入れ、Vero細胞をベトリディッシュ内に播種した。これに5%のCO<sub>2</sub>を含有する空気を供給しながら37°Cでインキュベートした。数時間後にはベトリディッシュ底面とPUF表面にVero細胞が付着伸展したことが顕微鏡により確認された。経時的に細胞が増殖することも確認された。最終的にVero細胞はPUF表面で阿呆和状態まで増殖したことを見認めた。定常期後半には、細胞が丸くなり、細胞同士が凝集して大きな細胞塊が認められた。死滅期に入ると、ベトリディッシュ底面の細胞は剥離し、PUF表面のVero細胞も著しく大きな凝集塊を形成した。

#### 実験例2

実験例1と同じ培地液を用い、かつ同様に処理され同一の付着糖蛋白質の吸着したPUFを用いた。このPUFと培地液とを直徑53mmのベトリディッシュに入れ、5%のCO<sub>2</sub>を含有する空気を3l/minの割合で供給しながら37°Cで30分間インキュベートした。このように処理したPUF40mgと培地液4mlとを含むベトリディッシュ培地を3組調製した。培地中のこれら3組のPUFに $10^4$  個/ml、 $10^5$  個/mlおよび $10^6$  個/mlの割合でVero細胞をそれぞれ播種した。ここで、 $10^4$  個/mlとは、培地液を含んだPUF1cm<sup>3</sup>あたり $10^4$  個の細胞を播種したことを示す。これを実験例1に準じて38時間培養し、細胞数を計数した。播種密度とPUF1あたりの細胞数との関係を第1図に示す。第1図から、細胞がPUFに付着する割合は播種密度によらずほぼ一定であることが確認された。

#### （実施例）

以下に本発明を実施例について説明する。

#### 実施例1

実施例1におけると同じ培地液および同じPUFを用いた。23mgのPUFと2mlの培地液とを含むベトリディッシュ培地を調製し、PUF表面にVero細胞を $1.04 \times 10^6$  個/g（PUF）の割合で播種した。5%のCO<sub>2</sub>を含有する空気を3l/minの割合で供給しながら37°Cにて23時間インキュベートしたのち、PUF表面から細胞が剥離しないように注意してサンプリングし、核数計数法を用いてPUFに付着しているVero細胞を計数した。細胞数は約 $4.5 \times 10^6$  個であり、細胞数がPUF表面でほぼ飽和していることが観察された。これは同じ大きさのベトリディッシュの底面を付着面として培養を行なった際の細胞数とほぼ同様である。

使用したPUFは23mgであるから、細胞密度は $1.95 \times 10^6$  個

/g (PUF) である。PUFの培地中の高体積は約26cm<sup>3</sup>/gであるから、これは $7.5 \times 10^6$ 個/cm<sup>3</sup> (培地液中のPUF)に相当する。これは、従来の技術の項で示したサイトテックス2を用いたマイクロキャリアー培養法に比べても2~3倍優れている。このように、本発明方法により高密度培養が効果的に達成される。

#### 実験例2

実験例1と同じ培地液と同じPUFを用いた。PUF90mg/c 2m<sup>1</sup>の培地液を入れたペトリディッシュ培地、PUF90mg/c 6mlの培地を入れたペトリディッシュ培地、および5mlの培地液のみを入れたペトリディッシュ培地をそれぞれ調製した。これにそれぞれ $8 \times 10^5$ 個、 $8 \times 10^6$ 個および $2 \times 10^6$ 個のVero細胞を播種し、実験例1に準じて培養を行なった。培養時間と細胞個数との関係を第2図に示す。PUFを用いた上記培養時の対数増殖期における倍加時間(D.T.)の測定を行なった。別に培地液の量を4mlとし、添加するPUFを0mg, 50mg, 70mg, 190mgとしそれぞれ実験を行い、対数増殖期におけるD.T.を測定した。培地液中にPUFが占める割合(g/1)とD.T.との関係を第3図に示す。

第2図および第3図より、PUFに対し培地液量の多い方が細胞の増殖速度が大きく、D.T.が小さいことがわかる。これは、PUFに対し培地液量が少ないとPUF表面で増殖する細胞の物質交換が阻害されるためと考えられる。PUFを入れないペトリディッシュで培養を行なった場合は増殖速度が大きいが、短時間でペトリディッシュ底面に飽和するため高密度に培養することはできない。

#### 実施例3

培養装置は、第4図に示すように、培養槽1と、漏壁塔2と、培地液供給槽3と、気体供給手段4とを有する。培養槽1は内部に多孔板11を収納しており、この多孔板11上にPUF110が載置される。この培養槽1には培地液循環路12を介して漏壁塔2が連結されている。この漏壁塔2には、培地液供給路23を介して培地液供給槽3および気体供給路24を介して気体供給手段4が連結されている。漏壁塔2では培養槽1からの変装培地液(もしくは培養液)が培地液流入口20から流入し、塔内壁面に沿って流下する間に、気体供給手段(例えば空気ポンベ41およびCO<sub>2</sub>ガスポンベ42などのガスポンベ)4から供給される気体と接触し気体を吸収する。新鮮な気体を吸収した培地液は培地液循環路21を通って再び培養槽1へ供給される。漏壁塔2ではこのように効果的なガス供給システムが機能し、有用な気体が供給されて培養槽1へ再び供給される。漏壁塔2の培地液流入口20は漏壁塔壁面に沿って液留部200を有し、培養槽1からの返送培地液がこの液留部200に入り塔壁から徐々に溢流して塔内へ流入する構成になっている。液留部200から塔内への流入量をより均一に保持するうえで、ガラスピーブなどのピーズ状物や多孔板などの層流創製手段201をこの液留部200内に配置することが行われる。漏壁塔2の上方には

コンデンサー202およびフィルター203が設けられる。気体供給路24にも必要に応じてフィルター240が設けられる。培地液循環路や培地液供給路には、適宜ローラーポンプなどの液送給手段60, 61が配置される。

上記装置を、培地液中に含有される生理活性物質などの生成物を連続的に系外に取り出しうる連続培養に供しうるよう、例えば、培養槽1にバルブ付培養液排出口10が設けられる。この排出口10と共に、もしくはこれに代えて、低分子物質を選択的に取り出す限外濾過膜を培地液循環路もしくは他の適当な箇所に配置することも可能である。

上記装置を、攪拌を伴う培養に供しうるよう、攪拌手段を例えば培養槽1内に配置することも可能である。

培地液供給槽3からの培地液を培地液供給路23を介して下記の要領で上記装置の各部へ供給したのち、培地液供給路23のバルブ101を閉じた。そして、培養槽1と漏壁塔2との間で培地液循環路12および21を介して培地液を100ml/minの速度で1時間循環させた。

培養槽1内にPUF5.8gそして培地液200ml;

漏壁塔2内に培地液200ml;

および培地液循環路12, 21およびローラーポンプ60に培地液を合計量で100ml。

次いで、PUF110c Vero細胞を $3.4 \times 10^7$ 個播種し、2時間静置後、50ml/minで培地液を循環させて充填層培養を開始した。培養時間とPUF単位重量あたりの細胞数との関係を第5図に示す。第5図において矢印は培養槽1のバルブ100を開放して培養槽1内の培地液を回収すると共に、培地液供給槽3から培地液を培地液供給路23のバルブ101を開放して上記要領にて装置各部へ供給したこと

を示す。

第5図より、培養150時間後の細胞数は $3 \times 10^9$ 個/gであり、高密度の培養が行われたことがわかる。

#### (発明の効果)

本発明によれば、このように多孔性物質を被付着物体として付着性動物細胞が効果的に培養される。従来の例えばマイクロキャリアー培養法やホロファイバー培養法に比べてもさらに高密度培養が達成される。本発明によれば、静置培養法、充填層培養法のいずれを用いても細胞が効果的に増殖する。特に充填層培養法を採用すると培養のスケールアップが容易であり、高密度かつ大量培養が可能となる。ポリウレタン発泡体などの多孔性物質は安価でもあるため付着性動物細胞の大量の培養が安価になされうる。本発明は、付着性動物細胞を用いたウイルスの研究、付着性動物細胞が生産する生理活性物質の製造や研究に好適に利用されうる。また、PUFなどの多孔性物質は、培養後、細胞の剥離も容易であり、再使用可能である。

#### 【図面の簡単な説明】

第1図は本発明方法により付着性動物細胞の静置培養を行なったときの播種密度と多孔性物質単位体積あたりの

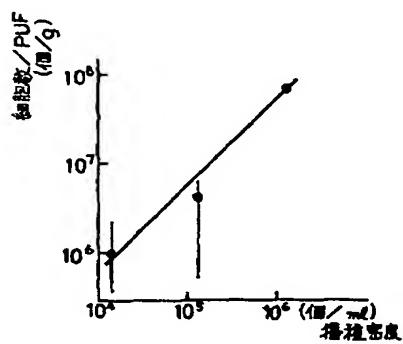
11

細胞数との関係を示すグラフ、第2図は本発明方法と従来法とによりそれぞれ付着性動物細胞を静置培養したときの、培養時間による細胞数の変化を比較したグラフ、第3図は本発明方法の静置培養時の単位培地液あたりの多孔性物質重量とD.T.との関係を示すグラフ、第4図は本発明の培養装置の1実施例を示す概略図、第5図は第\*

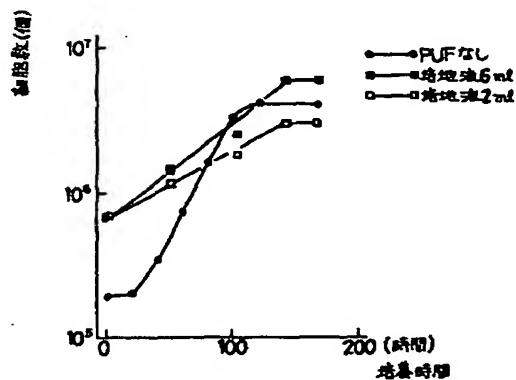
12

\* 4図の装置を用いて充填層培養を行なったときの培養時間による動物細胞数の変化を示すグラフである。  
1……培養槽, 2……漏壁塔, 3……培地液供給槽, 4……気  
体供給手段, 11……多孔板, 12, 21……培地液循環路, 20…  
…培地液流入口, 23……培地液供給路, 110……PUF, 200…  
…液留部。

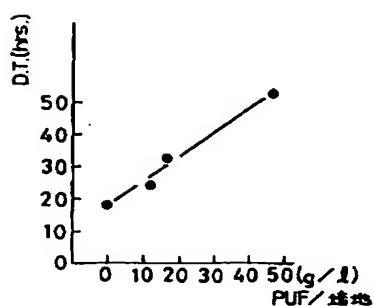
【第1図】



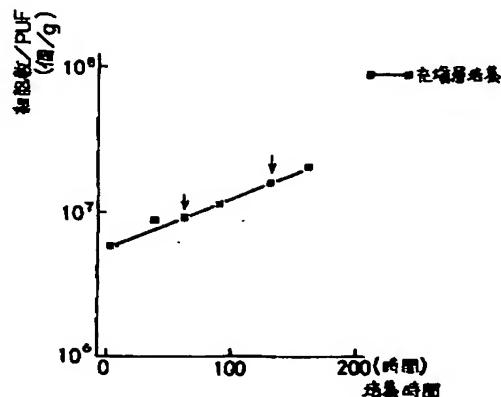
【第2図】



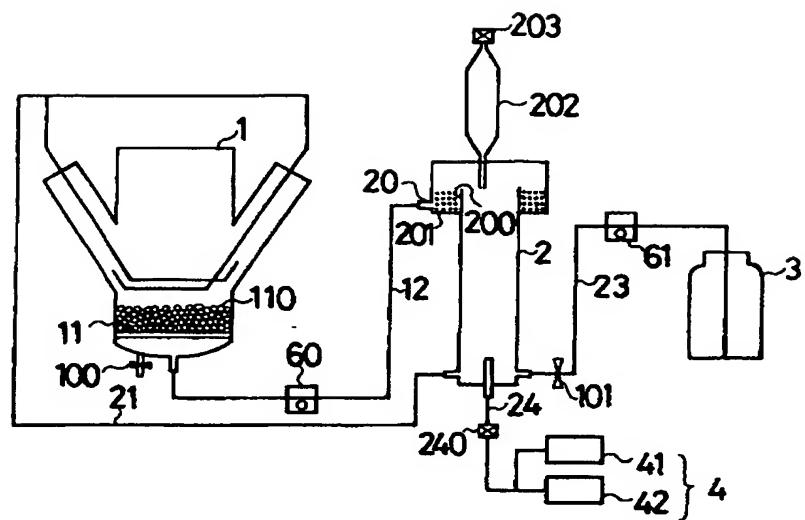
【第3図】



【第5図】



【第4図】



[JP,07-046988,B]

---

CLAIMS DETAILED DESCRIPTION TECHNICAL FIELD PRIOR ART EFFECT OF THE  
INVENTION TECHNICAL PROBLEM OPERATION EXAMPLE DESCRIPTION OF DRAWINGS  
DRAWINGS

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

**CLAIMS**

[Claim(s)]

[Claim 1] Cultivation of the adhesive animal cell which includes sinking culture-medium liquid into the porous polyurethane foam whose average pore size is 100 micrometers – 1mm, or flooding this porous polyurethane foam with culture-medium liquid, making an adhesive animal cell adhere to this porous polyurethane foam, and cultivating this adhesive animal cell.

[Claim 2] Cultivation given in the 1st term of a patent claim by which the peptide matrix was formed in the molecule of the aforementioned polyurethane.

[Claim 3] Cultivation given in the 2nd term of a patent claim whose peptide which forms the aforementioned peptide matrix is a collagen, albumin, or gelatin.

[Claim 4] Cultivation given in the 1st term of a patent claim or the 2nd term whose expansion ratio of the aforementioned polyurethane foam is ten to 20 times.

[Claim 5] The aforementioned adhesive animal cell An African green monkey nephrocyte (Vero cell), A normal bat lung cell (Tb1Lu), an epithelial cell (940c3), a mouse fiber blast cell (3T3), The man striated-muscle ape comber (cell RD) man striated-muscle ape comber cell (A204), The first nestling germ fiber blast cell, a Chinese hamster ovary cell (CHO), A suckling hamster nephrocyte (BHK), the first embryo cheek cell, a man double-precision somatic cell (W1-38.MRC-5), the claim which is an ape nephrocyte (Vero, LLC-MK2, valve flow coefficient-1), the first ape nephrocyte, a man \*\*\* cell (MRC-5), a rabbit nephrocyte (RK-13), a pig nephrocyte (IBR-52), a dog nephrocyte, a cat lung fiber blast like cell, or a fish cell -- cultivation given in the 1st term

[Claim 6] Cultivation given in the 1st term of a patent claim which is gentle placement cultivation, packed bed cultivation, a continuous-culture method, or a spinner-culture method.

[Claim 7] The cultivation tub which holds the adhesive animal cell which average pore size adheres to the porous polyurethane foam which is 100 micrometers – 1mm, and grows on a perforated plate with this porous polyurethane foam, The wetted wall tower connected with this cultivation tub through the culture-medium liquid circuit, and the gas supply means connected through the culture-medium liquid supply tub and gas supply way which were connected with this wetted wall tower through the culture-medium liquid supply way, The culture apparatus of the adhesive animal cell which supplies the culture-medium liquid with which it \*\*\*ed, this culture-medium liquid and this gas were contacted in this wetted wall tower, and the gas was supplied to a cultivation tub through this culture-medium liquid circuit.

[Claim 8] A culture apparatus given in the 7th term of a patent claim by which the peptide matrix was formed in the molecule of the aforementioned polyurethane.

[Claim 9] A culture apparatus given in the 8th term of a patent claim whose peptide which forms the aforementioned peptide matrix is a collagen, albumin, or gelatin.

[Claim 10] A culture apparatus given in the 7th term of a patent claim or the 8th term whose expansion ratio of the aforementioned polyurethane foam is ten to 20 times.

[Claim 11] The aforementioned adhesive animal cell An African green monkey nephrocyte (Vero cell), A normal bat lung cell (Tb1Lu), an epithelial cell (940c3), a mouse fiber blast cell (3T3), The man striated-muscle ape comber (cell RD) man striated-muscle ape comber cell (A204), The first nestling germ fiber blast cell, a Chinese hamster ovary cell (CHO), A suckling hamster

nephrocyte (BHK), the first embryo cheek cell, a man double-precision somatic cell (W1-38.MRC-5), the claim which is an ape nephrocyte (Vero, LLC-MK2, valve flow coefficient-1), the first ape nephrocyte, a man \*\*\*\* cell (MRC-5), a rabbit nephrocyte (RK-13), a pig nephrocyte (IBR-52), a dog nephrocyte, a cat lung fiber blast like cell, or a fish cell -- a culture apparatus given in the 8th term

[Claim 12] A culture apparatus given in the 7th term of a patent claim which has a means by which the aforementioned cultivation tub collects the physiological active substances in culture medium.

[Claim 13] A culture apparatus given in the 12th term of a patent claim whose aforementioned physiological-active-substance recovery means is a ultrafiltration membrane.

[Claim 14] A culture apparatus given in the 7th term of a patent claim which is the culture medium exhaust port with a bulb by which the aforementioned physiological-active-substance recovery means was prepared in the aforementioned cultivation tub.

[Claim 15] A culture apparatus given in the 7th term of a patent claim which prepared the culture medium churning means in the aforementioned cultivation tub.

[Claim 16] A culture apparatus given in the 7th term of a patent claim in which the culture-medium liquid flow entrance of the aforementioned wetted wall tower has \*\*\*\*\* along with the wall surface of this wetted wall tower.

[Claim 17] A culture apparatus given in the 16th term of a patent claim which has the laminar-flow invention means which makes a liquid flow a laminar flow at the aforementioned \*\*\*\*\*.

[Claim 18] A culture apparatus given in the 17th term of a patent claim whose aforementioned laminar-flow invention means is a bead-like object.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

**DETAILED DESCRIPTION**

[Detailed Description of the Invention]

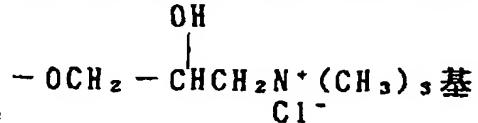
(Field of the Invention)

this invention relates an adhesive animal cell to the high-density-cultivation method of the adhesive animal cell cultivated as an affix-ed object, and its culture apparatus in the porous matter.

(Prior art)

An animal cell is divided roughly into two cell populations from a cultivation gestalt. One of them is the cell of the planktonic represented by the cell of a blood system, and others are adhesive cells which need the field where a cell adheres like the fibroblast or an epithelium sexual cell. Since it increases in the state where it suspended in the culture medium, a planktonic cell can be easily increased by the method according to cultivation of a microorganism. On the other hand, since the adhesion side (affix-ed object) used as the scaffold of proliferation is required for an adhesive cell, extensive and high-density cultivation is difficult for it.

In recent years, micro carrier cultivation, hollow-fiber cultivation, ceramic porosity pipe cultivation, microcapsule cultivation, etc. are proposed as a method that an adhesive animal cell can be cultivated comparatively in large quantities and with high density. Especially, micro carrier cultivation does not need complicated equipment, but since operation is comparatively easy, it is used suitably. Micro carrier cultivation is a method using the macromolecule particle (micro carrier) whose diameter is about 100–300 micrometers as an affix-ed object. There are a polyacrylamide, a dextran, gelatin, polystyrene, etc. as a material of a micro carrier. On for



example, a bridge formation dextran front face

The micro carrier (site DEKKUSU2(Cytodex2); Pharmacia manufacture) which it \*\*\*\*\*ed and was used as the surface-charge type is used suitably. The cultivation density in micro carrier cultivation For example, above-mentioned site DEKKUSU 2 [micro carrier cell to which it is reported that they are about 2.0x10<sup>6</sup> to 4.0x10<sup>6</sup> pieces (micro carrier solid content)/ml when it uses at a rate of 3mg per 1ml of culture medium and a Vero cell (after-mentioned) is cultivated culture Pudding SHIPURUZU and -- MESOZZU, Pharmacia Fine KEMIKARUZU(Microcarrier cell culture principles & methods, Pharmacia Fine Chemicals.)]. However, in this micro carrier cultivation, high density and a mass culture must yet have been attained fully.

For the purpose, such as obtaining the physiological active substance of the minute amount contained in an animal cell, development of the method in which the high density and mass culture of an adhesive animal cell are possible is desired.

(Trouble which invention tends to solve)

The purpose of this invention is to offer the method that an adhesive animal cell can be cultivated with high density and in large quantities. Other purposes of this invention are to offer the culture apparatus in which it is used for the above-mentioned method and deals.

(The means and operation for solving a trouble)

It includes that the adhesive animal cell cultivation of this invention sinks culture-medium liquid into the porous matter, or flood it with culture-medium liquid in the porous matter, it makes an adhesive animal cell adhere to this porous matter, and cultivates this adhesive animal cell, and the above-mentioned purpose is attained by that.

The cultivation tub which holds the adhesive animal cell which the adhesive animal cell culture apparatus of this invention adheres to the porous matter, and is grown on a perforated plate with this porous matter, The wetted wall tower connected with this cultivation tub through the culture-medium liquid circuit, and the gas supply means connected through the culture-medium liquid supply tub and gas supply way which were connected with this wetted wall tower through the culture-medium liquid supply way, It \*\*\*\*\*, this culture-medium liquid and this gas are contacted in this wetted wall tower, the culture-medium liquid with which the gas was supplied is supplied to a cultivation tub through this culture-medium liquid circuit, and the above-mentioned purpose is attained by that.

The porous matter used for this invention should just have the water-absorption-power force by the matter which does not receive metabolism by the animal cell aiming at cultivation. For example, natural organisms, such as a synthetic-resin foam and sponge, are used, and it gets. As a synthetic-resin foam, foams, such as polyvinyl alcohol and polyurethane, are used, for example. Since especially the foam of polyurethane that has polyoxyethylene structure has the outstanding hydrophilic property and outstanding water holding power, it is used suitably. Such polyurethane makes the polyol and the poly isocyanate which have polyoxyethylene structure react, and is obtained. As a polyol which has polyoxyethylene structure, the polyethylene-glycol-polypropylene glycol which is the copolymer of the mixture; ethyleneoxide and propylene oxide of a polyethylene-glycol; polyethylene glycol and a polypropylene glycol is mentioned, for example. A basic polyol is also usable. With a basic polyol here, an ethyleneoxide is made to add to amines, such as ethylenediamine, a diethylenetriamine, a monomethylamine, a butylamine, a piperazine, an ethanolamine, propanolamine, and N-methyldiethanolamine, in the shape of a polyoxyethylene, and it is obtained. As a polyol which has the above-mentioned polyoxyethylene structure, molecular weight about 400 to 1000 polyethylene glycol is used suitably. When a polypropylene component is added by the polyethylene glycol, it is desirable that the content turns around the about 65 weight section the bottom. The hydrophilic property of the foam obtained as it is superfluous falls.

As the above-mentioned poly isocyanate, the various poly isocyanates, such as an aromatic system, aliphatic system, and polyether system, are used, for example. For example, - tri-isocyanate etc. is mentioned tolylene diisocyanate, diphenylmethane diisocyanate, diphenyl diisocyanate, naphthalene diisocyanate, xylenediisocyanate, butane diisocyanate, and -4-4'4" of triphenylmethane colors.

It mixes with the polyol which is independent about a polyol without polyoxyethylene structure, or has the above-mentioned polyoxyethylene structure, is used, and gets. As such a polyol, a glycerol, trimethylolethane, a trimethylol propane, 1, 2 and 6-hexane triol, a pentaerythritol, a sorbitol, a saccharose, and alpha-methyl glucoside are mentioned, for example. As a polyol, naturally-occurring polymers, such as a cellulose, a carboxymethyl cellulose, and a hydroxymethyl cellulose, and the derivative of those are also used, and it gets.

If peptide, such as a collagen, albumin, and gelatin, is made to live together in the system of reaction at the reaction time of a polyol and the poly isocyanate, the polyurethane by which the peptide matrix was formed in the molecule will be obtained. If the foam of the polyurethane by which the peptide matrix was formed in the molecule is used as porous matter, the water content of the porous matter will become high and the wetting of the porous matter and culture-medium liquid will become good. Consequently, the compatibility of an adhesive animal cell and the porous matter becomes high, and multiplication of this cell becomes more prompt.

as a foam -- both a half-continuation foam and a continuation foam -- although -- it is used and gets Since it is so good that the culture-medium liquid containing oxygen tends to contact, it is desirable to use a continuation foam.

The average pore size of the porous matter is 100 micrometers - 1mm preferably 10 micrometers - 5mm. If pore size is too small, it will be hard coming to increase a cell inside the

porous matter, and if too large, the specific surface area of the porous matter will become small. If the specific gravity of the appearance of such porous matter is 0.02–0.1 and it is a foam, the expansion ratio is about ten to 50 times.

The cell which can be cultivated by the cultivation of this invention is the fiber blast cell of an animal, a lymph cell, or an epithelial cell preferably that what is necessary is just an adhesive animal cell. Preferably Furthermore, an African green monkey nephrocyte (Vero cell), a normal bat lung cell (Tb1Lu), An epithelial cell (940c3), a mouse fiber blast cell (3T3), a man striated-muscle ape comber cell (RD), A man striated-muscle ape comber cell (A204), the first nestling germ fiber blast cell, a Chinese hamster ovary cell (CHO), A suckling hamster nephrocyte (BHK), the first embryo cheek cell, a man double-precision somatic cell (W1-38.MRC-5), Although it is an ape nephrocyte (Vero, LLC-MK2, valve flow coefficient-1), the first ape nephrocyte, a man \*\*\*\* cell (MRC-5), a rabbit nephrocyte (RK-13), a pig nephrocyte (IBR-52), a dog nephrocyte, a cat lung fiber blast like cell, or a fish cell, it is not limited to these.

Culture stand still and packed bed cultivation are contained in the cultivation of the adhesive animal cell using the porous matter of this invention.

In order to enforce cultivation of this invention, equipment equipped with the cultivation tub which holds the adhesive animal cell which adheres to the porous matter and is grown on a perforated plate with this porous matter, and the wetted wall tower which is connected with this cultivation tub through a culture-medium liquid circuit, and supplies a gas to culture-medium liquid is used. The culture-medium liquid supply tub is connected with the wetted wall tower. for performing stationary culture -- the perforated-plate top of a cultivation tub -- for example, the porous matter preferably used as the 1–3mm split is laid 10mm or less, and after supplying culture-medium liquid and infiltrating this into the porous matter, a desired animal cell is inoculated into culture-medium liquid or the porous matter (seeding) There is especially no limit that what is necessary is just more than the amount of the culture-medium liquid which the porous matter may absorb as an amount of culture-medium liquid. Since it is stationary culture, although circulation of culture-medium liquid is not performed, it is desirable to perform one culture-medium exchange on one – the 3rd. And if it cultivates under temperature required for growth of a cell, and atmosphere, this animal cell will increase a porous matter front face promptly as a scaffold. The proliferation rate of an animal cell is so large that there is much culture-medium volume to the porous matter, and the growth saturation density of the animal cell in the inside of the porous matter is high. for example, a polyurethane foam (PUF) -- using -- the below-mentioned Vero cell -- cultivating (PUF23mg, 2ml of culture media) -- the high saturation density  $7.5 \times 10^6$  pieces /3 (inside PUF of culture-medium liquid) is obtained cm

In order to enforce packed bed cultivation, laminating restoration of the porous matter is carried out on the perforated plate of a cultivation tub at a multilayer, the gas content culture-medium liquid from a wetted wall tower is supplied [ then, ] under growth temperature, and a desired animal cell is inoculated. And the gas content culture medium from a wetted wall tower is continuously supplied through a culture-medium liquid circuit. Since the culture-medium liquid with which required gases, such as sufficient oxygen, were supplied is supplied to an animal cell according to such restoration tub cultivation, high density cultivation is attained. For example, if a Vero cell is cultivated supplying enough the air which contains CO<sub>2</sub> using PUF5.8g into a culture medium, the number doubling time of cells of a logarithmic growth phase is 71 hours, it will increase 75 times and the high density cultivation  $1.7 \times 10^7$  pieces /3 will be attained cm on the 24th.

While supplying culture-medium liquid continuously using the above-mentioned equipment, by taking out cultivation products, such as a physiological active substance obtained, out of a system continuously, a continuous-culture method is attained and it gets. As an ejection means of a cultivation product, a culture-medium liquid exhaust port with a bulb is prepared in a cultivation tub, for example. It is also possible to use the ultrafiltration membrane which takes out the low-molecular matter alternatively.

If an adhesive animal cell performs slow speed stirring of a grade which does not exfoliate from a porous matter front face, spinner culture will be attained and it will get. In this case, in order that the contact degree of a cell and the culture-medium liquid which contains oxygen so much may

go up, while the growth rate of this cell becomes quick, since a cultivation product is spread effectively in culture-medium liquid, the yield of a product improves. The stirring means is suitably established in the cultivation tub.

(Example)

The preliminary example of an experiment for carrying out this invention is shown below. The cell used here is a Vero cell (the origin and the feature are shown below).

Vero cell: The adhesive cell of the kidney origin of an African green monkey. A form is the fiber bud. It is an established cell line and unlimited proliferation is carried out. A globular form cell is the diameter of about 13.5 micrometers. It is used for production of virus simian virus 40 etc. If a PETORI dish base is cultivated as an adhesion side, it will double in about 18 hours.

After adding NaHCO<sub>3</sub>, HEPES, penicillin G, and streptomycin to the example of experiment 1DME synthetic medium (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. make) and adjusting the last concentration to NaHCO<sub>3</sub>12.5mM, HEPES5mM, penicillin G 105 U/l, and streptomycin 0.1 g/l, fetal calf serum (FBS) was further added to this, and it considered as culture-medium liquid.

PUF (25 times as many expansion ratio as this) by which the peptide matrix was formed in the molecule was applied to the mixer, and it ground to the split 3mm or less. Except for the impurity, it sterilized with the autoclave after rinsing with distilled water. This was \*\*\*\*(ed) in the above-mentioned culture-medium liquid, and the adhesion glycoprotein in a blood serum was made to fully stick to a PUF front face. This PUF and above-mentioned culture medium were put into the PETORI dish within the clean bench, and seeding of the Vero cell was carried out into PETORIDISHU. It incubated at 37 degrees C, supplying the air containing 5% of CO<sub>2</sub> to this.

Several hours after, it was checked under the microscope on the PETORI dish base and the PUF front face that the Vero cell had carried out adhesion expansion. It was also checked that a cell increases with time. Finally it checked having increased the Vero cell to the stupid sum state on the PUF front face. The cell became round, cells condensed in the second half of a stationary phase, and the big cell lump was accepted. When it went into the death phase, the cell at the base of a PETORI dish exfoliated, and the Vero cell on the front face of PUF also formed the remarkable big aggregate.

PUF to which it was processed similarly and the same adhesion glycoprotein stuck was used, using the same culture-medium liquid as the example 1 of example of experiment 2 experiment. This PUF and culture-medium liquid were put into the PETORI dish with a diameter of 53mm, and it incubated for 30 minutes at 37 degrees C, supplying the air containing 5% of CO<sub>2</sub> at a rate of 3 l/min. Thus, 3 sets of PETORI dish culture media containing processed PUF40mg and 4ml of culture-medium liquid were prepared. Seeding of the Vero cell was carried out to these [ in a culture medium ] 3 sets of PUF(s), respectively at 104 pieces [ ml ] /, 105 pieces/ml, and 106 rate/ml. Here, having carried out seeding of the 104 cells per PUF1cm<sup>3</sup> which contained culture-medium liquid in 104 pieces/ml is shown. This was cultivated for 38 hours according to the example 1 of an experiment, and counting of the number of cells was carried out. The relation between seeding density and the number of cells per PUF1g is shown in a view 1. From the view 1, the rate at which a cell adheres to PUF was not based on seeding density, but it was checked that it is simultaneously regularity.

(Example)

this invention is explained about an example below.

Also in example 1 example 1, the same culture-medium liquid and the same PUF were used. The PETORI dish culture medium containing 23mg PUF and 2ml culture-medium liquid was prepared, and seeding of the Vero cell was carried out to the PUF front face at 1.04x10<sup>8</sup> rate (PUF)/g. after incubating at 37 degrees C for 23 hours, 3 l/min coming out comparatively and supplying the air containing 5% of CO<sub>2</sub>, a cell does not exfoliate from a PUF front face — as — being careful — sampling — a nuclear number — counting — counting of the Vero cell which has adhered to PUF using a method was carried out. The number of cells is about 4.5x10<sup>6</sup> pieces, and it was observed that the number of cells is mostly saturated with the PUF front face. This is the same as that of the number of cells at the time of cultivating by making the base of the PETORI dish of the same size into an adhesion side almost. Since used PUF is 23mg, cell density is 1.95x10<sup>8</sup> pieces (PUF)/g. Since the bulk volume in the inside of the culture medium of PUF is

about 26cm<sup>3</sup>/g, 7.5x10<sup>6</sup> [ / ] of these are equivalent to 3 (PUF in double \*\*\*\*) cm. even if it compares this with the micro carrier cultivation using site DEKKUSU 2 shown by the term which is a Prior art, it is excellent two to 3 times Thus, high density cultivation is effectively attained by this invention method.

The same PUF as the same culture-medium liquid as the example 1 of example of experiment 2 experiment was used. The PETORI dish culture medium which put 2ml culture-medium liquid into PUF90mg, the PETORI dish culture medium which put the 6ml culture medium into PUF90mg, and the PETORI dish culture medium which put in only 5ml culture-medium liquid were prepared, respectively. Seeding of 8x10<sup>5</sup> pieces, 8x10<sup>5</sup> pieces, and the 2x10<sup>5</sup> Vero cells was carried out to this, respectively, and it cultivated according to the example 1 of an experiment. The relation between cultivation time and the cell number is shown in a view 2. The doubling time (D. T.) in the logarithmic growth phase at the time of the above-mentioned cultivation using PUF was measured. The amount of culture-medium liquid was independently set to 4ml, PUF to add was set to 0mg, 50mg, 70mg, and 190mg, it experimented, respectively, and D.T. in a logarithmic growth phase was measured. The relation of the rate (g/l) and D.T. which PUF occupies in culture-medium liquid is shown in a view 3.

A view 2 and the 3rd view show that the direction with much culture-medium volume has the large proliferation rate of a cell, and D.T. is small to PUF. To PUF, this will be considered because matter exchange of the cell increased on a PUF front face is checked, if there is little culture-medium volume. Although a proliferation rate is large when cultivating by the PETORI dish which does not put in PUF, since it is saturated for a short time on a PETORI dish base, it cannot cultivate to high density.

Example 3 culture apparatus has the cultivation tub 1, a wetted wall tower 2, the culture-medium liquid supply tub 3, and the gas supply means 4, as shown in a view 4. The cultivation tub 1 has contained the perforated plate 11 inside, and PUF110 is laid on this perforated plate 11. The wetted wall tower 2 is connected with this cultivation tub 1 through the culture-medium liquid circuit 12. The gas supply means 4 is connected with this wetted wall tower 2 through the culture-medium liquid supply tub 3 and the gas supply way 24 through the culture-medium liquid supply way 23. a wetted wall tower 2 -- the disguise culture-medium liquid (or culture medium) from the cultivation tub 1 -- from the culture-medium liquid flow entrance 20 -- flowing -- a column -- while flowing down along with an internal surface, the gas supplied from the gas supply means (for example, chemical cylinders, such as the air bomb 41 and CO<sub>2</sub> chemical cylinder 42) 4 is contacted, and a gas is absorbed The culture-medium liquid which absorbed the fresh gas is again supplied to the cultivation tub 1 through the culture-medium liquid circuit 21. In a wetted wall tower 2, a gas supply system effective in this way functions, a useful gas is supplied, and the cultivation tub 1 is supplied again. the culture-medium liquid flow entrance 20 of a wetted wall tower 2 -- a wetted-wall-tower wall surface -- meeting -- \*\*\*\*\* 200 -- having -- the return culture-medium liquid from the cultivation tub 1 -- this \*\*\*\*\* 200 -- entering -- from \*\*\* -- gradually -- an overflow -- carrying out -- a column -- it has composition which flows inside the column from \*\*\*\*\* 200 -- when holding the inflow inside to homogeneity more, arranging the laminar-flow invention meanses 201, such as bead-like objects, such as a glass bead, and a perforated plate, in this \*\*\*\*\* 200 is performed, and it gets A capacitor 202 and a filter 203 are formed above a wetted wall tower 2. A filter 240 is formed also in the gas supply way 24 if needed. The liquid feeding meanses 60 and 61, such as a roller pump, are arranged suitably on a culture-medium liquid circuit or a culture-medium liquid supply way.

The culture medium exhaust port 100 with a bulb is formed in the cultivation tub 1 so that the continuous culture which can be continuously taken out out of a system can be presented with products, such as a physiological active substance which contains the above-mentioned equipment in culture-medium liquid. this exhaust port 100 -- or it is also possible to replace with this and to arrange the ultrafiltration membrane which takes out the low-molecular matter alternatively in a culture-medium liquid circuit or other suitable parts

It is also possible to arrange a churning means for example, in the cultivation tub 1 so that the cultivation accompanied by churning can be presented with the above-mentioned equipment. After supplying the culture-medium liquid from the culture-medium liquid supply tub 3 to each

part of the above-mentioned equipment in the following way through the culture-medium liquid supply way 23, the bulb 101 of the culture-medium liquid supply way 23 was closed. And culture-medium liquid was circulated at the rate of 100 ml/min through the culture-medium liquid circuits 12 and 21 for 1 hour between the cultivation tub 1 and the wetted wall tower 2.

It is 100ml at the total quantity about culture-medium liquid in the cultivation tub 1 to culture-medium liquid 200ml; the culture-medium liquid circuits 12 and 21, and low RAPOPU 60 in PUF5.8g and the 200ml; wetted wall tower 2 of culture-medium liquid.

Subsequently,  $3.4 \times 10^7$ -piece seeding of the Vero cell was carried out to PUF110, after 2-hour gentle placement, culture-medium liquid was circulated by 50 ml/min, and packed bed cultivation was started. The relation between cultivation time and the number of cells per PUF unit weight is shown in a view 5. While an arrow opens the bulb 100 of the cultivation tub 1 wide and collecting the culture-medium liquid in the cultivation tub 1 in a view 5, having opened the bulb 101 of the culture-medium liquid supply way 23 wide, and having supplied the culture-medium liquid supply tub 3 to culture-medium liquid to each part of equipment in the above-mentioned way is shown.

The number of cells 150 hours after cultivation is  $3 \times 10^7$  pieces/g, and a view 5 shows that high-density cultivation was performed.

#### (Effect of the invention)

According to this invention, an adhesive animal cell is effectively cultivated by using the porous matter as an affix-ed object in this way. Even if compared with for example, conventional micro carrier cultivation and conventional hollow-fiber cultivation, high density cultivation is attained further. According to this invention, even if it uses any of culture stand still and packed bed cultivation, a cell increases effectively. If especially packed bed cultivation is adopted, the scale-up of cultivation will be easy and high density and the mass culture of it will become possible. Since porous matter, such as a polyurethane foam, is also cheap, a lot of cultivation of an adhesive animal cell is made cheaply, and deals in it. this invention is used suitable for research of the virus which used the adhesive animal cell, and the manufacture and research of a physiological active substance which an adhesive animal cell produces, and it deals in it. Moreover, ablation of a cell is also easy for porous matter, such as PUF, after cultivation, and it is reusable.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

---

**[Brief Description of the Drawings]**

When a view 1 performs stationary culture of an adhesive animal cell by this invention method The graph which shows the relation between \*\*\*\*\* density and the number of cells per porous matter unit volume, and a view 2 by this invention method and the conventional method Respectively an adhesive animal cell Change of the number of cells by the cultivation time when carrying out stationary culture The compared graph, When the graph with which a view 3 shows the relation between the porous matter weight per unit culture-medium liquid at the time of the stationary culture of this invention method and D.T., the schematic diagram showing [ 4 ] one example of the culture apparatus of this invention, and a view 5 perform packed bed cultivation using the equipment of a view 4 It is the graph which shows change of the number of animal cells by \*\*\*\*\* time.

1 [ .. A culture-medium liquid supply tub 4 / .. A gas supply means, 11 / .. 12 A perforated plate, 21 / .. A culture-medium liquid circuit, 20 / .. A culture-medium liquid flow entrance, 23 / .. A culture-medium liquid supply way, 110 / .. PUF, 200 / .. \*\*\*\*\*. ] .... A cultivation tub, 2 .. A wetted wall tower, 3

---

**[Translation done.]**

---